Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 4, Winter 2023, p. 471-486

Effect of Short-Term Supplementation of N-3 PUFA on the Acute Phase Response of Holstein Calves

Saeid Kamel Oroumieh[1,2], Reza Valizadeh[3], Abbas Ali Naserian[3*]

Received: 14-04-2021
Revised: 22-12-2021
Accepted: 15-01-2022
Available Online: 15-01-2022

How to cite this article:
Kamel Oroumieh, S., Valizadeh, R., & Naserian, A.A. (2023). Effect of short-term supplementation of N-3 PUFA on the acute phase response of holstein calves. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *14*(4),471-486.
DOI: 10.22067/ijasr.2022.69822.1016

Introduction To date, there is not any accurate estimation of calf mortality in the world; however, annual pre-weaning calves' mortality was estimated to be around 7.8, 6.5, 5.5, and 2.6% in the United States, Iran, China, and Sweden, respectively. Raboisson et al. (2013) represented that most neonatal calf mortality happens at age under one month. Hill et al. (2011) reported that nutritional factors could modulate the calf immune system's functions. Studies on non-ruminants confirm that the consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFA) relating to the n-3 FA can affect the immune response. In calves' nutrition, using PUFA in milk or milk replacer (MR) had a pleasant effect on immune responses and antioxidant status. Supplementation n-3 FA, especially EPA and DHA, would increase the proportion of PUFA in the membrane phospholipids, which might change the performance of the immune system. The n-3 PUFA plays a critical role in influencing the immune system through various mechanisms described in detail by Calder (2012). Previous studies showed that adding n-3 PUFA to milk or MR decreases the symptoms of diarrhea and inflammatory diseases caused by viral or bacterial infections. So far, there are not enough reports regarding dietary n-3 PUFA on the APR in neonatal calves. Nevertheless, most research regarding FO supplementation and its anti-inflammatory effects on neonatal calves' health has been done on long-term consumption. As earlier mentioned, most calf mortality occurs at the first 30 days of age; consequently, long-term (more than one month) consumption of FO might not provide clear evidence to evaluate the anti-inflammatory effect of FO on the status of neonatal calves' health. Therefore, the purpose of this study was the first evaluation of short-term supplementation of n-3 PUFA on the APR of neonatal calves.

Materials and Methods Twenty-four bull calves, with a mean age of 34.5 ± 3.7 days, were housed outdoors in individual pens bedded with wheat straw at the dairy farm facilities of Astan Quds Razavi Animal Husbandry and Agriculture Co. (Mashhad, Iran) in February 2019. The criteria for calf selection were, namely, the type of calf delivery (without any difficulty) and no history of disease or diarrhea. To achieve a quantitative similarity between calves, we used age and body weight as further criteria. The experiment's duration was 11 days (a week before LPS challenge and three days after LPS challenge) with an adaptation period (seven days). After the adaptation period, calves were weighed (57.5 ± 4.4 kg) and randomly assigned to 1 of 4 groups (six calves/group). Randomized calves received treatments during the study period according to the group they were already allocated: 1. negative control group (NC), 2. Positive control group (LPS challenge, PC), 3. Tallow 350 mg/kg BW group + LPS (TA), 4. Fish oil 350 mg/kg BW group + LPS (FO). All calves were fed the same diet, 5 L/d of whole milk, and had free access to freshwater during the experiment. The PC, FO, and TA groups were

1- Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- Laboratory of Chemical Analysis, Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820, Merelbeke, Belgium.
3- Professor of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
*Corresponding Author Email: Naserian@um.ac.ir

intravenously challenged with 0.5 µg/kg BW ultrapure LPS from *E. coli* serotype O111:B4 (Sigma–Aldrich: registered; product NO. L2630) on day eight. Treatments FO and TA were mixed with whole milk and were offered two times a day (at 0800 and 1700). FO and TA groups were isocaloric to compare the effect of manipulating fatty acid intake in the same level of energy intake on the APR of neonatal calves. The blood samples were collected at 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48, 72 h, post LPS challenge (p.c.) to evaluate inflammatory condition. The clinical signs (RT, RR, and HR) were recorded at 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18, 24 h p.c. According to Plessers et al.'s (2015) model, the appearance of behavioral phases (respiratory, depression, and recovery phase) was assessed. Data were analyzed as a completely randomized design by using JMP (13.2) software.

Results and Discussion The results of this study confirm previous experiments that showed a significant increase of cytokines level by the LPS administration (26, 29). As expected, the IL-6 increased when the TNF-α decreased (Maximal level at 3 and 1 h p.c., respectively). There was no significant difference in cytokines and APPs between PC, FO, and TA, while the FO had the minimum level. The typical sickness behavior of LPS-challenged calves was distinguished as respiratory, depression, and recovery phases according to Plessers et al.'s (2015) model. In this study, there was no significant effect of decreasing n-6/n-3 FA ratio on sickness behavior. Besides, the level of inflammatory cytokines and acute-phase proteins were not affected by experimental groups. These results were in line with McDonnell et al., (2019) reported no FO effect on immune function during the pre-weaning period. Although the level of DHA + EPA requirement for calves has not been well known, studies represented that their highest level in humans is 5 g/d. Stanley et al. (2007) concluded that the n-6/n-3 FA ratio might not be a helpful concept and distracts attention from increasing absolute intakes of long-chain n-3 FA. In this regard, Flaga et al. (2019) represented that DHA-rich algae supplementation in milk replacer could decrease cytokines' mRNA expression. They suggested that 3 g/d DHA might be the maximum level in neonatal calves' diet with an appropriate effect on the immune system. In the current study, NC, PC, and TA received 2 mg/d, and FO received 3 g/d DHA. It might be worthwhile considering the amount of DHA + EPA when FO is used as an n-3 PUFA source in calves' diet.

Conclusion The results showed that decreasing the n6/n3 FA ratio in diets by supplementing FO could not affect acute phase response in calves. Besides, short-term supplementation of FO could not improve calves' immune systems as no differences in cytokines and APP between PC and FO were observed. Although sickness behavior in FO finished sooner than PC, there was no significant difference between them. In this study, increasing MUFA intake could not affect APR in calve. It seems that more studies are needed to evaluate the effect of EPA and DHA on the performance and health status of calves.

Key Words: Calf, Fatty acids, Fish oil, Inflammation, Lipopolysaccharide, Tallow

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

جلد ۱٤، شماره ٤، زمستان ۱٤۰۱، ص ٤٨٦-٤٧١

بررسی اثر مصرف کوتاه‌مدت اسیدهای چرب n-3 دارای چند پیوند دوگانه بر پاسخ فاز حاد در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین

سعید کامل ارومیه[۱و۲]، رضا ولی زاده[۳]، عباسعلی ناصریان[۳*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۵

چکیده

هدف از این مطالعه، تعیین اثرات مصرف کوتاه‌مدت اسیدهای چرب n-3 با منشأ روغن ماهی بر پاسخ به فاز حاد القا شده از طریق چالش لیپوپلی‌ساکارید در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین بود. تعداد ۲۴ رأس گوساله نر هلشتاین با میانگین سن ۳/۷ ± ۳۴/۵ روز به‌طور کاملاً تصادفی به چهار گروه زیر تقسیم شدند: (۱) گروه شاهد منفی (عدم تزریق لیپوپلی‌ساکارید بدون دریافت مکمل‌های خوراکی، NC)، (۲) گروه شاهد مثبت (تزریق لیپوپلی‌ساکارید بدون دریافت مکمل‌های خوراکی، PC)، (۳) گروه چربی پیه، ۳۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن + تزریق لیپوپلی‌ساکارید (TA)، (۴) گروه روغن ماهی، ۳۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن + تزریق لیپوپلی‌ساکارید (FO). در طول دوره آزمایش گوساله‌ها با جیره خوراکی یکسان و پنج لیتر شیر پاستوریزه در روز تغذیه شدند. طول دوره آزمایش ۱۱ روز به‌علاوه یک دوره هفت‌روزه عادت‌پذیری بود. در روز هشتم آزمایش گروه‌های PC، TA و FO به‌صورت تزریق وریدی ۰/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن لیپوپلی‌ساکارید دریافت کردند. جهت ارزیابی شرایط التهاب، در طی بازه‌های زمانی پیاپی پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید خون‌گیری و دمای رکتوم، نرخ تنفس و ضربان قلب اندازه‌گیری شد. به‌دنبال آن، غلظت پلاسمایی سایتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های فاز حاد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی نمی‌تواند منجر به مهار تولید سایتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های فاز حاد در پاسخ به تزریق لیپوپلی‌ساکارید شود. همچنین، مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی تأثیر معنی‌داری بر فازهای رفتاری در گوساله‌های تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید نداشت هر چند منجر به پایان سریع‌تر فاز افسردگی و ریکاوری شد. بنابراین، این آزمایش نشان داد مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی در راستای کاهش نسبت اسیدهای چرب n-6 به n-3 در جیره غذایی گوساله‌های شیرخوار تأثیری بر پاسخ فاز حاد در آن‌ها ندارد.

واژه‌های کلیدی: التهاب، چربی پیه، روغن ماهی، گوساله، لیپوپلی‌ساکارید

مقدمه

نرخ مرگ‌ومیر گوساله‌های تازه متولد شده به‌عنوان یک شاخص تعیین‌کننده سطح سلامت در گله‌های گاو شیری شناخته می‌شود (Ortiz-Pelaez *et al*., 2008). هر ساله مرگ‌ومیر گوساله‌های شیرخوار منجر به ضرر و زیان اقتصادی قابل توجهی در صنعت پرورش گاوهای شیرده می‌شود و چالش بزرگ این صنعت می‌باشد. تا امروز تخمین دقیقی از نرخ مرگ‌ومیر گوساله‌های شیرخوار در جهان وجود ندارد، با این حال این شاخص در کشورهای آمریکا، ایران، چین، و سوئد به‌ترتیب ۷/۸، ۶/۵، ۵/۵، و ۲/۶ درصد در سال تخمین زده شده است (Olsson *et al*., 1993; Azizzadeh *et al*., 2012; Zhang *et al*., 2019). بیشترین مرگ‌ومیر گوساله‌های شیرخوار در سن کمتر از سی‌روزگی گزارش شده است، به‌طوری‌که در سال ۲۰۱۳ میلادی نرخ مرگ‌ومیر گوساله‌های شیرخوار با سن کمتر از سی روز در مزارع فرانسه در حدود ۵/۷ درصد در سال گزارش شده است (Raboisson *et al*., 2013). در راستای کاهش مرگ‌ومیر گوساله‌های شیرخوار هیل و همکاران (Hill *et al*., 2011) گزارش کردند می‌توان با افزایش کیفیت جیره غذایی گوساله‌های شیرخوار،

۱- فارغ التحصیل دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

۲- گروه بهداشت عمومی و امنیت غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه گنت بلژیک.

۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

(*- نویسنده مسئول: (Email: Naserian@um.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2022.69822.1016

عملکرد سیستم ایمنی آن‌ها را بهبود بخشید. مطالعات با حیوانات غیرنشخوارکننده نشان داده است، مصرف اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چند پیوند دوگانه (Polyunsaturated fatty acids; PUFA) بر پاسخ سیستم ایمنی مؤثر بوده است (Bjørkkjær *et al*., 2004؛ Brunborg *et al*., 2008؛ Calder, 2013). استفاده از PUFA در شیر و یا جایگزین شیر اثرات مثبتی بر پاسخ ایمنی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی در گوساله‌های شیرخوار داشته است (Garcia *et al*., 2006؛ Hill *et al*., 2011؛ Karcher *et al*., 2014). مصرف اسیدهای چرب غیر اشباع n-3 به‌ویژه ایکوزاپنتاانوئیک اسید (Eicosapentaenoic acid) و دکوزاهگزاانوئیک اسید (Docosahexaenoic acid) می‌توانند منجر به افزایش نسبت PUFA در فسفولیپیدهای غشای سلولی شوند که نتیجه آن تغییر عملکرد سیستم ایمنی خواهد بود (Calder, 2012). اسیدهای چرب غیر اشباع n-3 از طریق مکانیسم‌های متنوعی بر سیستم ایمنی تأثیر گذاشته و منجر به بهبود عملکرد آن می‌شوند، جزئیات مکانیسم‌های تحت تأثیر این اسیدهای چرب توسط کالدر بررسی و گزارش شده است (Calder, 2012). مطالعات گذشته نشان داده است، مکمل کردن اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چند پیوند دوگانه n-3 (n-3 PUFA) در شیر گوساله‌ها منجر به کاهش عارضه اسهال و بیماری‌های التهابی ناشی از ویروس‌ها و باکتری‌های عفونت‌زا می‌شود (Ballou *et al*., 2008؛ Hill *et al*., 2011؛ Karcher *et al*., 2014). با این حال، اطلاعات زیادی در رابطه با اثرات n-3 PUFA بر پاسخ فاز حاد در گوساله‌های شیرخوار وجود ندارد (Ballou *et al*., 2008؛ Karcher *et al*., 2014).

لیپوپلی‌ساکارید به‌عنوان ماده اصلی تشکیل‌دهنده غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی شناخته شده است (Plessers *et al*., 2015؛ Ulevitch *et al*., 1999). در بیماری‌های گوساله‌ها، لیپوپلی‌ساکارید عامل بروز بیماری و علایم کلینیکی مهمی مانند اندوتوکسمی است (Cullor, 1992؛ Olson *et al*., 1995؛ Plessers *et al*., 2015). لیپوپلی‌ساکارید باکتریایی یکی از مؤثرترین تحریک‌کننده‌های سیستم ایمنی در پستانداران به‌شمار می‌رود (Seydel *et al*., 2003؛ Wyns, 2014). هنگامی که لیپوپلی‌ساکارید از غشاء خارجی آزاد می‌شود، بخش لیپید A آن اثر سمی داشته و با فعال‌سازی سیستم ایمنی ذاتی، منجر به ایجاد پاسخ التهابی و فاز حاد می‌شود (Van Amersfoort *et al*., 2003). در پستانداران، پاسخ فاز حاد یک توالی فرایند هماهنگ‌شده‌ای است که در محل التهاب پس از ایجاد عفونت آغاز می‌شود و باعث تولید و انتشار انواع واسطه‌های التهابی، تعاملات سلولی، عروقی و تغییرات متابولیکی می‌شود (Baumann and Gauldie, 1994؛ Gruys *et al*., 2004). در طی پاسخ فاز حاد مونوسیت‌های خون و یا ماکروفاژهای بافتی، ابتدا از طریق رهاسازی سایتوکین‌های اولیه همچون فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-α) و متعاقباً تحریک رهاسازی سایتوکین‌های ثانویه همچون اینترلوکین شش (IL-6) منجر به ایجاد آبشار پاسخ فاز حاد و افزایش قابل توجهی در سطوح پلاسمایی این سایتوکین‌ها می‌شوند. TNF-α، اینترلوکین یک (IL-1) و IL-6 در تنظیم واکنش‌های وابسته به تب و تنظیم دمای بدن نقش دارند و منجر به بروز تب می‌شوند (Wyns, 2014). به‌علاوه، پیرو تحریک سایتوکین‌ها، سنتز پروتئین‌های کبدی تحت تأثیر قرار گرفته که این عامل منجر به افزایش و یا کاهش غلظت قابل توجهی از پروتئین‌های فاز حاد در پلاسما می‌شود (Gruys *et al*., 2004؛ Wyns, Baumann and Gauldie, 1994؛ 2014).

علی‌رغم تأثیر به‌سزای لیپوپلی‌ساکارید بر بروز بیماری و پاسخ فاز حاد در گوساله‌های شیرخوار، تا امروز مطالعات کمی در زمینه بررسی اثرات ترکیبات طبیعی ضد التهاب همچون منابع اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چند پیوند دوگانه n-3 تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید در گوساله‌های شیرخوار وجود دارد. دراین راستا، کارچر و همکاران (Karcher *et al*., 2014) نشان دادند، مکمل کردن روغن ماهی به‌میزان دو درصد جیره در شیر منجر به کاهش بیان ژن سایتوکین‌های پیش التهابی شده و تمایل به کاهش پاسخ تب در گوساله‌های تحت چالش واکسیناسیون *Pasteurella* شده است. بالو و همکاران (Ballou *et al*., 2008) با افزودن دو درصد روغن ماهی (به‌طور سرک) به شیر گوساله‌های شیرخوار نژاد جرزی، نشان دادند روغن ماهی می‌تواند علائم کلینیکی و برخی متابولیت‌های بیوشیمیایی مؤثر در پاسخ فاز حاد را بهبود بخشد. در این راستا، مکمل کردن روغن ماهی در جیره خوراکی جوندگان منجر به کاهش تولید سایتوکین‌های پیش التهابی و کاهش غلظت باز چرخه TNF-α، IL-1β و IL-6 در سیتوپلاسم تحت شرایط چالش اندوتوکسین شد (Billiar *et al*., 1988؛ Sadeghi *et al*., 1999). لیو و همکاران (Liu *et al*., 2003) با اضافه کردن روغن ماهی به جیره خوک‌ها تمایل به کاهش تولید سایتوکین‌های پیش التهابی تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید را نشان دادند. با این حال، در آزمایشات دیگر، اضافه کردن n-3 PUFA به جیره خوراکی نتوانسته است تأثیری بر سطح پلاسمایی سایتوکین‌های التهابی در انسان داشته باشد (Thies *et al*., 2001؛ Wallace *et al*., 2003). در این راستا، کالدر (Calder, 2013) نشان داده است مکمل شدن کمتر از دو گرم در روز از DHA + EPA احتمالاً سطح ناکافی برای دریافت اثرات ضد التهابی روغن ماهی باشد.

اگر چه شواهدی مبنی براثرات ضد التهابی مصرف کوتاه‌مدت منابع دریایی n-3 PUFA بر پاسخ ایمنی وجود دارد (Bjørkkjær *et al*., 2004؛ Brunborg *et al*., 2008؛ Madland *et al*., 2006). با این حال، اغلب مطالعات مرتبط با مکمل کردن روغن ماهی در جیره خوراکی گوساله‌های شیرخوار در بازه زمانی بلندمدت انجام شده است.

درحالی‌که، بیشترین نرخ مرگ‌ومیر گوساله‌های شیرخوار در سن کمتر از ۳۰ روزگی رخ می‌دهد، بنابراین مصرف بلندمدت روغن ماهی (بیشتر از یک ماه) ممکن است شواهد کافی برای ارزیابی اثرات ضد التهابی روغن ماهی بر سطح سلامت گوساله‌های شیرخوار را فراهم نکند، بنابراین هدف از این آزمایش بررسی اثرات ضد التهابی n-3 PUFA با منبع دریایی در یک دوره مصرف کوتاه‌مدت تحت شرایط القاء فاز حاد در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش و تیمارها

در این آزمایش، ۲۴ رأس گوساله نر هلشتاین با میانگین سن ۳/۷ ± ۳۴/۵ روز مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش در بهمن‌ماه ۱۳۹۷ در مجموعه مزرعه آستان قدس رضوی به انجام رسید. گوساله‌ها از بدو تولد تا از شیرگیری در جایگاه انفرادی با پوشش کاه گندم نگهداری شدند. جهت ایجاد حداکثر شباهت بین گوساله‌های آزمایش معیارهایی همچون عدم بیماری و بروز اسهال، تولد بدون سخت‌زایی، وزن و سن برای انتخاب گوساله‌ها مورد استفاده قرار گرفت. طول دوره آزمایش ۱۱ روز به‌علاوه یک دوره عادت‌پذیری به‌مدت هفت روز در نظر گرفته شد. گوساله‌ها بعد از پایان دوره عادت‌پذیری وزن شده (۴/۴ ± ۵۷/۵) و به‌طور کاملاً تصادفی به چهار گروه زیر تقسیم شدند: (۱) گروه شاهد منفی (در این گروه تیمارهای خوراکی و همچنین تزریق لیپوپلی‌ساکارید به‌کاربرده نشده است و تنها تحت تزریق سرم نمکی قرار گرفته اند، NC)، (۲) گروه شاهد مثبت (در این گروه تیمارهای خوراکی استفاده نشده است و تنها تحت تزریق لیپوپلی‌ساکارید قرارگرفته‌اند، PC)، (۳) گروه چربی پیه، ۳۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن + تزریق لیپوپلی‌ساکارید (TA)، (۴) گروه روغن ماهی، ۳۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن به‌علاوه تزریق لیپوپلی‌ساکارید (FO). تمام گوساله‌ها از جیره یکسان بر اساس سطح احتیاجات معرفی شده در NRC (۱۲) به‌صورت دسترسی آزاد تغذیه شدند (جدول ۱). گوساله‌ها روزانه به‌میزان پنج لیتر شیر در دو وعده صبح و عصر مورد تغذیه قرار گرفته و در طول دوره آزمایش دسترسی آزاد به آب تازه داشتند. پروفایل اسیدهای چرب شیر و روغن ماهی در جدول ۲ مشاهده می‌شود. در این آزمایش، گروه‌های NC، PC، TA و FO به‌ترتیب نسبت‌های اسیدهای چرب اشباع به اسیدهای چرب غیر اشباع شامل ۲/۳، ۲/۳، ۱/۵ و ۱؛ اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دوگانه به اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چند پیوند دوگانه شامل ۶/۷، ۶/۷، ۱۰/۵ و ۱/۵ و اسیدهای چرب n-6 به اسیدهای چرب n-3 شامل ۸، ۸، ۵/۸ و ۰/۲ را از شیر و تیمارهای خوراکی (روغن ماهی و چربی پیه) دریافت کردند (جدول ۲). در این مطالعه روش القاء فاز حاد، بررسی فازهای رفتاری و نمونه‌برداری بر اساس آزمایشات پلیسر و همکاران (Plessers *et al*., 2015) و کامل ارومیه و همکاران (Kamel Oroumieh *et al*., 2020) صورت پذیرفت.

در انتهای دوره عادت‌پذیری از انروفلاکساسین به‌میزان پنج میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای جلوگیری از احتمال وقوع عفونت‌های ریوی در طول دوره آزمایش به‌صورت تزریق زیر جلدی استفاده شد. از ابتدای دوره عادت‌پذیری تا روز تزریق لیپوپلی‌ساکارید روزانه وضعیت سلامت گوساله‌ها از جمله اسکور مدفوع، ضربان قلب، تعداد تنفس و سلامت ظاهری آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در طی دوره عادت‌پذیری (روز ۷- الی ۱) و همچنین طول دوره آزمایش (روز ۱ الی ۱۱) هیچ‌گونه عارضه اسهال و یا بیماری مشاهده نشد. در روز هفتم آزمایش (یک روز قبل از تزریق لیپوپلی‌ساکارید) گوساله وزن‌کشی شده (۴/۹ ± ۶۰/۶) و سپس آنژیوکت خاکستری (16G) جهت تسهیل در تزریق لیپوپلی‌ساکارید و نمونه‌برداری خون در ورید گردنی گوساله‌ها قرار گرفت. در روز هشتم از آزمایش گروه‌های PC، TA و FO به‌صورت تزریق وریدی به‌میزان ۰/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید خالص (*E. coli* serotype O111:B4, Sigma–Aldrich®; product NO. L2630) قرار گرفتند. به‌میزان مشابه سرم نمکی به گروه NC تزریق شد. یک ساعت قبل از تزریق لیپوپلی‌ساکارید وضعیت سلامت ظاهری، دمای رکتوم و ضربان قلب گوساله‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. از دمای رکتوم ۳۹/۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای شاخص جهت حذف گوساله از طرح استفاده شد. تیمارهای خوراکی روغن ماهی (روغن کیلکا، شرکت محصولات دریایی پارس کیلکا، مازندران، ایران) و چربی پیه (شرکت روغن اعلا سپاهان، اصفهان، ایران) از روز اول تا روز پایان آزمایش (روز ۱ الی ۱۱) به‌صورت ترکیب با شیر در دو وعده در اختیار گوساله‌ها قرار گرفت. جهت ارزیابی اثرات تغییر اسیدهای چرب غیر اشباع خوراکی بر پاسخ فاز حاد در گوساله‌های شیرخوار دو گروه FO و TA ایزوکالریک در نظر گرفته شدند.

جدول ۱- مواد تشکیل‌دهنده و ترکیبات شیمیایی جیره آغازین تغذیه شده به گوساله‌ها

Table 1- Ingredients and chemical composition of starter fed to calves

مواد خوراکی Ingredients	مقدار (درصد از ماده خشک) Value (%DM)
یونجه Alfalfa hay	10
ذرت Corn	45
جو Barley	9
کنجاله سویا Soybean meal	24
گلوتن ذرت Corn gluten meal	1.8
سبوس گندم Wheat bran	6.5
کمپلکس ویتامین و موادمعدنی[۱] Vitamins and minerals premix[1]	0.9
بی‌کربنات سدیم Sodium bicarbonate	0.9
کلسیم کربنات Calcium carbonate	0.9
بنتونیت Bentonite	0.5
نمک Salt	0.5
ترکیبات موادمغذی Nutrient composition	
ماده خشک DM, % as fed	90
پروتئین خام Crude protein	19.5
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber (NDF)	17
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber (ADF)	9.1
چربی خام Fat	3
کلسیم Ca	0.7
فسفر P	0.5
انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاکالری در کیلوگرم)[۲] Calculated ME (Mcal/kg of DM)[2]	3.15

[۱] در هر کیلوگرم مکمل: ویتامین آ ۲۵۰۰۰۰ واحد بین‌الملل در کیلوگرم، ویتامین د ۵۰۰۰۰ واحد بین‌الملل در کیلوگرم، ویتـامین ای ۱۵۰۰ واحد بین‌الملل در کیلوگرم، کلسیم ۱۲۰ گرم در کیلوگرم، فسفر ۲۰ گرم در کیلوگرم، منیزیم ۲۰/۵ گرم در کیلـوگرم، سـدیم ۱۸۶ گـرم در کیلوگرم، روی ۷/۷ گرم در کیلوگرم، منگنز ۲/۲۵ گرم در کیلوگرم، آهن ۱/۲۵ گرم در کیلـوگرم، گـوگرد ۳ گـرم در کیلـوگرم، کبالـت ۱۴ میلی‌گرم در کیلوگرم، مس ۱/۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم، ید ۵۶ میلی‌گرم در کیلوگرم، سلنیوم ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم.

[۲] با استفاده از نرم‌افزار NRC (۲۰۰۱) محاسبه شد.

[1] Contained per kilogram of supplement: 250,000 IU of vitamin A, 50,000 IU of vitamin D, 1,500 IU of vitamin E, 120 g of Ca, 20 g of P, 20.5 g of Mg, 186 g of Na, 7.7 g of Zn, 2.25 g of Mn, 1.25 g of Fe, 3 g of S, 14 mg of Co, 1.25 g of Cu, 56 mg of I, and 10 mg of Se.

[2] Metabolizable energy using NRC (2001) equations.

جهت ارزیابی اثرات لیپوپلی‌ساکارید بر پاسخ فاز حاد، یک ساعت قبل از تزریق لیپوپلی‌ساکارید (روز هشتم ساعت هفت صبح یک ساعت پس از مصرف شیر وعده صبحگاهی) یک نمونه خون به‌عنوان نمونه شاهد از همه گروه‌ها گرفته شد. برای ارزیابی شرایط التهاب، در طی بازه‌های زمانی ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید خون‌گیری انجام شد. علائم کلینیکی همچون دمای رکتوم، نرخ تنفس و ضربان قلب در طی بازه‌های زمانی ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید تعیین شد. در ابتدا، نرخ تنفس تعیین سپس وارد جایگاه انفرادی شده و ضربان قلب و دمای رکتوم اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری دمای رکتوم از دماسنج الکترونیکی هشداردهنده استفاده شد. در طی ۱۸ ساعت ابتدائی پس از القاء التهاب دو دامپزشک وضعیت کلینیکی و سلامت گوساله‌ها را ارزیابی می‌کردند. در طی ۱۲ ساعت ابتدائی پس از القاء التهاب بروز تنگی نفس، سرفه، وضعیت روحی، موقعیت و نحوه دراز کشیدن، نشستن و ایستادن گوساله‌ها و همچنین اشتهای آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس مدل معرفی شده توسط پلیسر و همکاران (Plessers *et al.*, 2015) وقوع سه فاز رفتاری (تنفسی، افسردگی و ریکاوری) پس از القاء التهاب تعیین و ارزیابی شد (شکل ۳). به‌طور خلاصه، وقوع سه فاز رفتاری بر اساس مدل ارائه شده توسط پلیسر و همکاران (Plessers *et al.*, 2015) بدین شرح است: آغاز فاز تنفسی با شروع تنگی نفس، افزایش نرخ تنفس و بروز سرفه تعیین و پایان آن بوسیله بهبودی از ناراحتی تنفسی و تعدیل نرخ تنفس تعیین شد. پایان فاز تنفسی (بهبودی از ناراحتی تنفسی) نشان‌دهنده آغاز فاز افسردگی است. در این مرحله، غالب گوساله‌ها دچار افسردگی ناشی از بروز تب شده و عمدتاً به‌صورت نشسته و یا دراز کشیده قرار می‌گیرند. این مرحله با پایان فاز تنفسی آغاز و با بروز نشانه‌های هوشیاری و تحرک، پایان می‌پذیرد. پایان فاز افسردگی همراه با آغاز فاز ریکاوری می‌باشد. در فاز ریکاوری گوساله‌ها به‌صورت طبیعی ایستاده و هوشیاری کامل دارند و تحرکات طبیعی مشاهده می‌شود. هوشیاری کامل همراه با تحرکات طبیعی و مصرف آب و غذا نشان‌دهنده اتمام کامل فاز ریکاوری می‌باشد. در صورت وقوع شوک سیستمیک گوساله از طرح خارج می‌شد. برای دسترسی به پلاسما نمونه‌های خون در دمای اتاق و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شده و در دمای ۲۰- تا زمان آنالیز نگهداری شدند. روش انجام آزمایش و نمونه‌برداری در این آزمایش مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه فردوسی مشهد به شماره سند ۱۳۹۹۰۱۹ قرار گرفت.

سنجش سایتوکین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد

جهت تعیین غلظت سایتوکین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد از نمونه‌های پلاسما به‌صورت دوتایی (دوپلی کیت) استفاده شد. برای ارزیابی سطوح فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-α)، اینترلوکین شش (IL-6)، هاپتوگلوبین (Hp) و سرم آمیلوئید آ (SAA)، کیت‌های الایزای ساخت کشور چین مورد استفاده قرار گرفت (Bioassay Technology Laboratory ELISA kits, Shanghai, China; Cat No. E0019BO, No. E0001BO, No. E0022BO, and No. E0023BO for TNF-α, IL-6, Hp, and SAA, respectively). همچنین برای تعیین سطوح TNF-α، IL-6 و SAA نمونه‌های پلاسما به‌ترتیب ۱۰، ۱۰، و ۲۰ مرتبه رقیق شدند. روش سنجش سایتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های فاز حاد مطابق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. سنجش درون سنجی (intra-assay CV) مورد محاسبه قرار گرفت و به‌ترتیب برای TNF-α، IL-6، Hp و SAA ۹/۴، ۹/۱، ۸/۲، ۹/۲ درصد می‌باشد. حساسیت تحلیلی (analytical sensitivities) این آزمایشات در پلاسما به‌ترتیب برای TNF-α، IL-6، Hp و SAA، ۵/۸۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر (pg/mL)، ۱۰/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر (pg/mL)، ۱/۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر (µg/mL) و ۰/۰۵۴ میکروگرم در میلی‌لیتر (µg/ml) توسط شرکت تولیدکننده معرفی شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری پس از بررسی تست نرمال، داده‌های نرمال به‌روش پارامتریک و داده‌های غیر نرمال به‌روش غیر پارامتریک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از روش آنالیز Kruskal-Wallis برای داده‌های غیر نرمال استفاده شد. جهت ارزیابی اثرات لیپوپلی‌ساکارید در گروه‌های مختلف از آزمون تحلیل تکرار در زمان یا واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated Measurement Of ANOVA) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (۱۳/۲) JMP به‌صورت کاملاً تصادفی با اثر ثابت تیمارها، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان و همچنین اثر تصادفی گوساله در تیمار انجام شد. قبل از تجزیه و تحلیل آماری، داده‌های مرتبط با سایتوکین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد به لگاریتم با پایه ۱۰ تبدیل شدند. جهت تعیین دقت تشخیصی پارامترهای بررسی شده از سطح زیر منحنی (AUC) برای نرخ تنفس (بازه زمانی صفرتا شش ساعت)، دمای رکتال و نرخ ضربان قلب (بازه زمانی صفر تا ۲۴ ساعت)، TNF-α (بازه زمانی صفر تا چهار ساعت)، IL-6 (بازه زمانی صفر تا شش ساعت)، Hp و SAA (بازه زمانی صفر تا ۲۴ ساعت) استفاده شد (Cullor, 1992). در نهایت، برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از روش آنالیز آماری LSMEANS Tukey HSD در سطح پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه، اثر مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی بـر پاسـخ فـاز حاد در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین بررسـی شـد. نتـایج نشـان داد، تغذیه کوتاه‌مدت روغن ماهی در جیره گوساله‌های شیرخوار منجـر بـه بهبود عملکرد سیستم ایمنی آن‌ها نخواهد شد. در روز هشـتم پـس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید به‌دلیل بروز علائم شوک شـدید، یـک گوسـاله متعلق به گروه چربی پیه (TA) از طرح خارج شد. بـا توجـه بـه عـدم وجود مدارک مبنی بر اثر سوء روغن پیه بر گوساله‌ها، به نظر می‌رسـد بـروز علائـم شـوک شـدید بـه‌دلیـل حساسـیت فـردی گوسـاله بـه لیپوپلی‌ساکارید بوده است.

در این آزمایش، نسبت کل اسیدهای چرب n-6 بـه n-3 (n-6/n-3 FA) مصرف شده در گـروه‌هـای NC، PC، TA و FO بـه‌ترتیـب ۸/۹، ۸/۹، ۷/۷ و ۰/۶ بود. این نسبت در گروه روغن ماهی ۱۴ مرتبـه کمتر از گروه‌هـای NC و PC و ۱۲ مرتبـه کمتـر از گـروه TA بـود (جدول ۲). نتایج به‌دست آمده نشان داد کاهش نسبت اسیدهای چرب n-6 بـه n-3 (از طریـق مصـرف منـابع دریـایی) در جیـره غـذایی گوساله‌های شیرخوار نمی‌تواند بر علائم کلینیکی و همچنـین سـطوح سایتوکین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید تـأثیر گذاشته و منجر به بهبود پاسخ فاز حاد در گوساله‌های شـیرخوار شـود. در ایـن راسـتا، اسـتنلی و همکـاران (Stanley *et al.*, 2007) نشـان دادند که تنها بیان نسبت اسیدهای چرب n-6/n-3 در جیـره خـوراکی یک شاخص مفید نبوده و می‌تواند منجر به عـدم توجـه بـه افـزایش مصرف اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر n-3 شـود. اگـر چـه تـا امروز سطح مورد نیاز مجموع اسـیدهای چـرب DHA و EPA بـرای گوساله‌های شیرخوار به‌خوبی شناخته نشده است، با این حال مطالعات نشان داده‌اند بالاترین سطح مجموع آن‌ها در انسان پـنج گـرم در روز است (Stanley *et al.*, 2007; Lewis and Bailes, 2011). در این راستا، فلگا و همکاران (Flaga *et al.*, 2019) توجه خـود را معطـوف به میزان مصرف اسید چرب DHA در گوساله‌های شـیرخوار کـرده و نشان دادند مکمل کردن جلبک دریـایی غنـی از DHA در جـایگزین شیر می‌تواند منجر به کاهش بیان ژن سایتوکین‌هـای التهـابی شـود. آن‌ها میزان سه گرم در روز DHA را به‌عنوان حداکثر میزان مصـرف روزانـه آن معرفـی کردنـد (Flaga *et al.*, 2019). در مطالعـه آن‌هـا افزایش مصرف DHA بیشتر از سه گرم در روز تـأثیری بـر عملکـرد سیستم ایمنی گوساله‌های شیرخوار نداشت و به‌علاوه منجر به کاهش وزن بدن در آن‌ها شد. در این آزمایش، سطح مصرف DHA بیشتر از سطح معرفی شده توسط فلگا و همکاران (Flaga *et al.*, 2019) نبود و به‌ترتیب گروه‌های NC، PC و TA دو میلی‌گرم در روز و گروه FO سه گرم در روز DHA دریافت کردند. با این حال، مصرف کوتاه‌مـدت روغن ماهی در گوساله‌های شیرخوار تأثیری بر عملکرد سیستم ایمنی آن‌ها نداشت و با نتایج مک دونل و همکاران (McDonnell *et al.*, 2019) همخوانی داشت. به نظر می‌رسد عدم تطابق نتـایج حاضـر بـا نتایج فلگا و همکاران (Flaga *et al.*, 2019) به‌دلیـل عـدم اسـتفاده آن‌ها از چالش لیپـوپلی‌سـاکارید باشـد. مطالعـات بیشـتری در زمینـه بررسی سطوح مناسـب مجمـوع اسـیدهای چـرب DHA و EPA در جیره گوساله‌های شیرخوار و تأثیر بر عملکرد سیستم ایمنی آن‌ها مورد نیاز است.

جدول ۲– غلظت مجموع اسیدهای چرب شیر، روغن ماهی و چربی پیه

Table 2- Fatty acids concentrations in milk, fish oil, and tallow

مجموع اسید چرب (درصد)[۱] Fatty acids (%)[1]	شیر Milk	روغن ماهی Fish oil	چربی پیه Tallow
اسیدهای چرب اشباع[۲] Saturated fatty acids[2]	65.3	28	42.4
اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دوگانه[۳] Monounsaturated fatty acids[3]	24.2	36.6	41.3
اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چند پیوند دوگانه n-6[۴] n-6 Polyunsaturated fatty acids[4]	3.2	2.1	2.1
اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چند پیوند دوگانه n-3[۵] n-3 Polyunsaturated fatty acids[5]	0.4	24	0.5

[۱] گروه‌های آزمایشی شاهد منفی (NC) و شاهد مثبت (PC) تنها از شیر و گروه‌های FO و TA علاوه‌بر شیر به‌ترتیب از مکمل‌های خوراکی روغن ماهی و چربی پیه تغذیه شدند.

[۲] شامل اسیدهای چرب: C4:0 + C6:0 + C8:0 + C10:0 + C11:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0.

[۳] شامل اسیدهای چرب: C14:1 + C16:1 + C17:1 + C18:1 + C20:1.

[۴] شامل اسیدهای چرب: C18:2 n-6 + C18:3 n-6 + C20:2 n-6 + C20:3 n-6 + C20:4 n-6.

[۵] شامل اسیدهای چرب: C18:3 n-3 + C20:3 n-3 + C20:4 n-3 + C20:5 n-3 + C22:5 n-3 + C22:6 n-3.

[1] Experimental groups including negative control (NC), and positive control (PC) were only fed by milk and the groups FO and TA were fed with milk supplemented with fish oil and tallow, respectively.

[2] Saturated fatty acids: C4:0 + C6:0 + C8:0 + C10:0 + C11:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0.

[3] Monounsaturated fatty acids: C14:1 + C16:1 + C17:1 + C18:1 + C20:1.

[4] n-6 Polyunsaturated fatty acids: C18:2 n-6 + C18:3 n-6 + C20:2 n-6 + C20:3 n-6 + C20:4 n-6.

[5] n-3 Polyunsaturated fatty acids: C18:3 n-3 + C20:3 n-3 + C20:4 n-3 + C20:5 n-3 + C22:5 n-3 + C22:6 n-3.

جدول ۳- اثر مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی و چربی پیه در پاسخ به چالش لیپوپلی‌ساکارید بر سطح زیر منحنی

Table 3- Effect of short-term consumption of fish oil and tallow in response to the LPS challenge on the area under the curve

آیتم Item	گروه‌های آزمایشی[۱] Experimental groups[1]			SEM	*P*-Value
	شاهد مثبت PC	روغن ماهی FO	چربی پیه TA		
سرم آمیلوئید آ[۲] SAA[2]	19	16	18	2.10	0.64
هاپتوگلوبین[۳] Hp[3]	11.4	11.6	13.8	1.86	0.61
اینترلوکین-۶ [۴] IL-6[4]	57	54	58	6.13	0.90
تی ان اف آلفا[۵] TNF-α[5]	23	21	25	2.82	0.63
نرخ تنفس[۶] RR[6]	336.8	332.8	334.6	19.7	0.98
نرخ ضربان قلب[۷] HR[7]	2364	2424	2680	92.8	0.06
دمای رکتوم[۸] RT[8]	937.4[a]	936.1[a]	943.7[b]	1.27	<0.01

[۱] گروه‌های آزمایشی: گروه شاهد مثبت (PC): در این گروه تیمارهای خوراکی استفاده نشده است و تنها تحت تزریق لیپوپلی‌ساکارید قرار گرفته‌اند، گروه روغن ماهی (FO): ۳۵۰ میلی‌گرم روغن ماهی در کیلوگرم وزن بدن + تزریق لیپوپلی‌ساکارید، گروه چربی پیه (TA): ۳۵۰ میلی‌گرم چربی پیه در کیلوگرم وزن بدن + تزریق لیپوپلی‌ساکارید (TA).

[۲] سطح زیر منحنی سرم آمیلوئید آ از زمان صفر الی ۷۲ ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ساعت).

[۳] سطح زیر منحنی هاپتوگلوبین از زمان صفر الی ۷۲ ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ساعت).

[۴] سطح زیر منحنی اینترلوکین ۶ از زمان صفر الی شش ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید (نانوگرم بر میلی‌لیتر در ساعت).

[۵] سطح زیر منحنی تی ان اف آلفا از زمان صفر الی چهار ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید (نانوگرم بر میلی‌لیتر در ساعت).

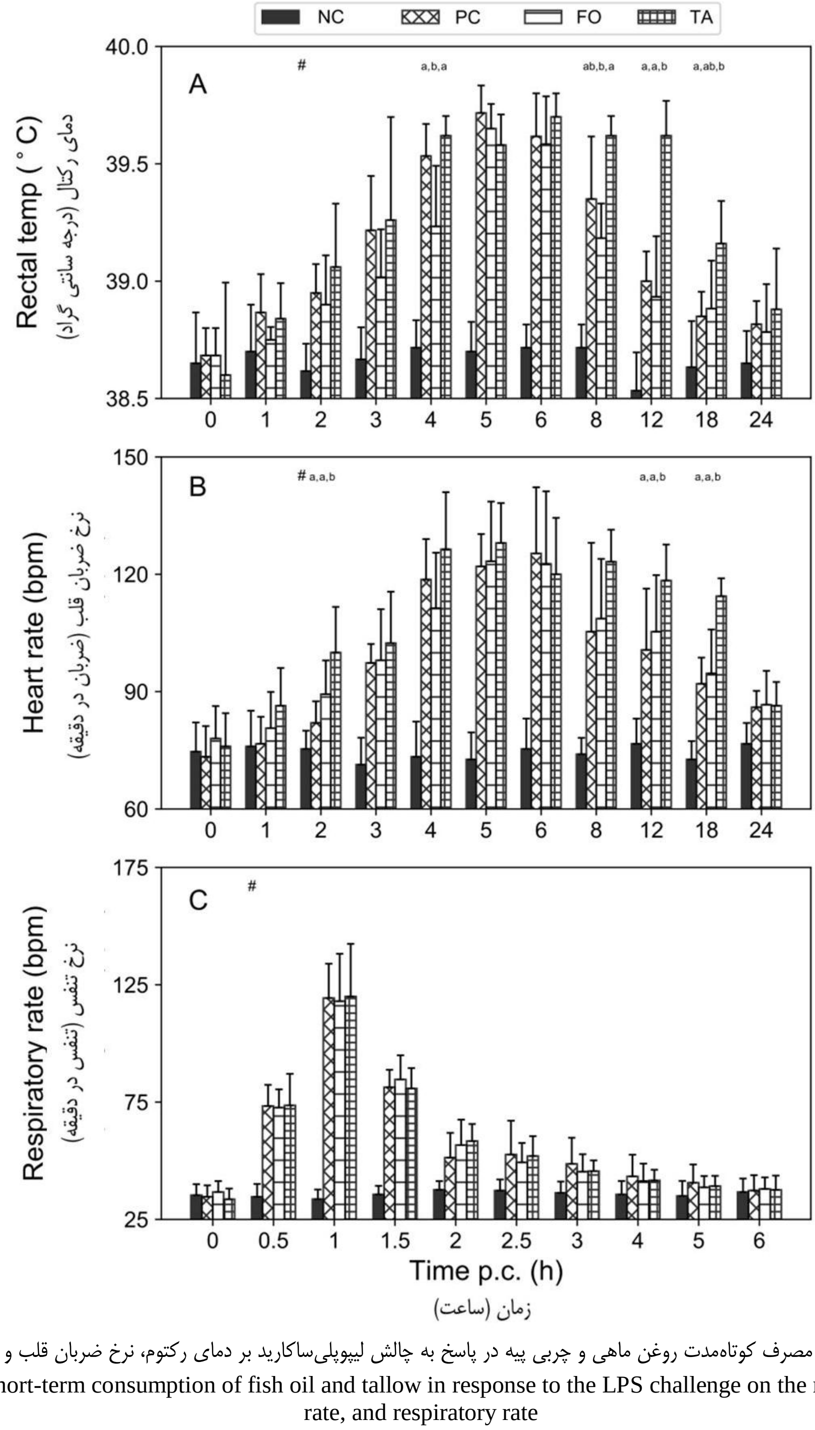
[۶] سطح زیر منحنی نرخ تنفس از زمان صفر الی شش ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید (تعداد تنفس در هر دقیقه در ساعت).

[۷] سطح زیر منحنی نرخ ضربان قلب از زمان صفر الی ۲۴ ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید (تعداد ضربان قلب در هر دقیقه در ساعت).

[۸] سطح زیر منحنی دمای رکتوم از زمان صفر الی ۲۴ ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید (درجه سانتی‌گراد در ساعت).

[1]Groups: PC = positive control; FO = fish oil 350 mg.kg^{-1} BW + LPS; TA = tallow 350 mg.kg^{-1} BW + LPS.
[2]SAA = serum amyloid A, AUC_{0-72h} (mg/mL × h).
[3]Hp = haptoglobin, AUC_{0-72h} (mg/mL × h).
[4]IL-6 = interleukin-6, AUC_{0-6h} (ng/mL × h).
[5]TNF-α = TNF-α, AUC_{0-4h} (ng/mL × h).
[6]RR = respiratory rate, AUC_{0-6h} (bpm × h).
[7]HR = heart rate, AUC_{0-24h} (bpm × h).
[8]RT = rectal temperature, AUC_{0-24h} (°C × h).

در این آزمایش میانگین نرخ تنفس، دمای رکتوم و نرخ ضربان قلب در زمان صفر روز هشتم آزمایش (یک ساعت قبل از تزریق لیپوپلی‌ساکارید) بین گروه‌ها به‌ترتیب ۴ ± ۳۵/۱ تنفس در دقیقه (bpm)، ۰/۲ ± ۳۸/۷ درجه سانتی‌گراد و ۷ ± ۷۵/۴ ضربان در دقیقه (bpm) بود. اثر القاء فاز حاد از طریق تزریق لیپوپلی‌ساکارید در گروه‌های PC، TA و FO بر علائم کلینیکی (نرخ تنفس، دمای رکتوم و نرخ ضربان قلب) و واسطه‌های التهابی (سایتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های فاز حاد) مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۳) که در راستای نتایج پلیسر و همکاران (Plessers *et al*., 2015) بود. مطابق آزمون تحلیل واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر، اثر زمان در پارامترهای اندازه‌گیری شده درون هر گروه تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید، معنی‌دار بود ($p< 0.05$). همچون نتایج پلیسر و همکاران (Plessers *et al*., 2015)، در طی دوره آزمایش هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در علائم کلینیکی در گروه NC مشاهده نشد و علائم بالینی طبیعی در گروه‌های تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید پس از ۲۴ ساعت از تزریق لیپوپلی‌ساکارید مشاهده شد. تفاوت معنی‌دار در دمای رکتوم و نرخ ضربان قلب بین گروه NC و گروه‌های تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید از دو ساعت پس از تزریق آن آغاز و تا ۱۸ ساعت پس از تزریق ادامه داشت ($p< 0.01$) (شکل ۱-A و B).

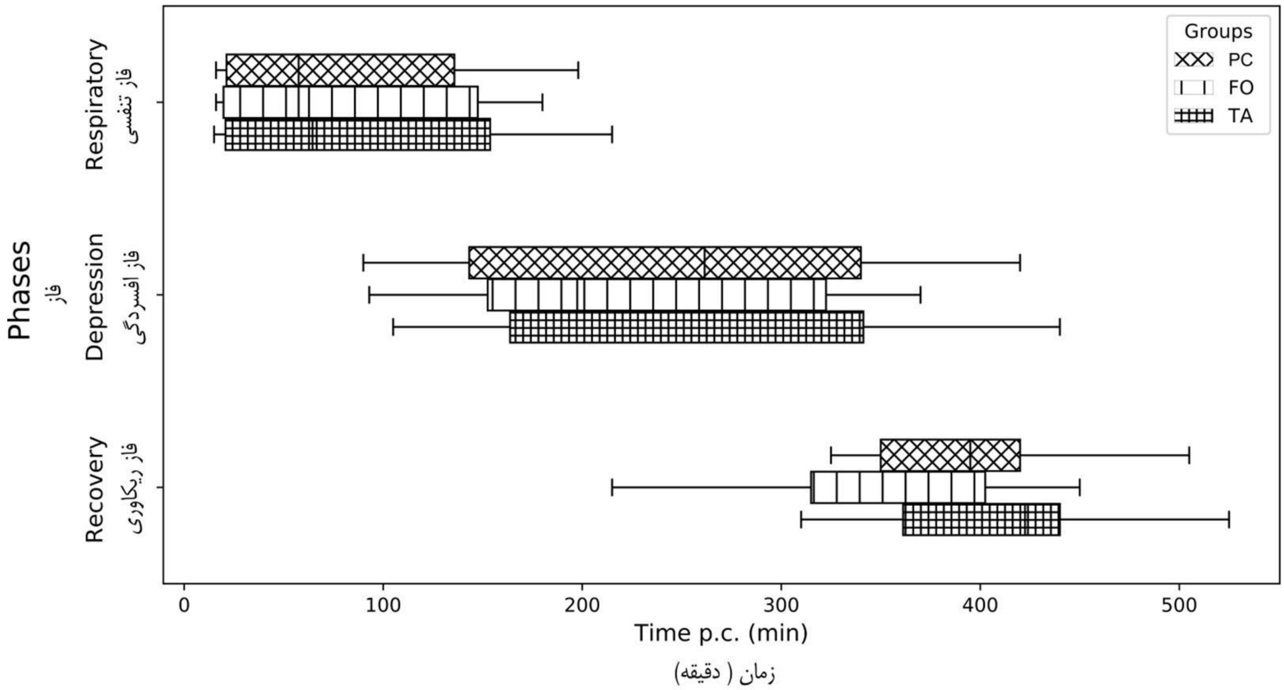


شکل ۱– اثر مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی و چربی پیه در پاسخ به چالش لیپوپلی‌ساکارید بر دمای رکتوم، نرخ ضربان قلب و نرخ تنفس

Figure 1- Effect of short-term consumption of fish oil and tallow in response to the LPS challenge on the rectal temperature, heart rate, and respiratory rate

در این آزمایش، حداکثر سطح دمای رکتوم برای گروه‌های PC و FO، پنج ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید مشاهده شد، این در حالی بود که گروه TA بالاترین سطح دمای رکتوم را نسبت به سایر گروه‌ها در طی بازه زمانی ۴ الی ۱۲ ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید نشان داد (شکل ۱). دمای رکتوم در گروه FO با تأخیر بیشتری نسبت به سایر گروه‌های تحت چالش افزایش یافت و همچنین در زمان کوتاه‌تری کاهش یافت، که می‌تواند متأثر از اثرات ضد التهابی روغن ماهی باشد. در چهار ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید، دمای رکتوم در گروه FO به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر گروه‌های تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید کمتر بود ($p<$

0.01). به‌علاوه، دمای رکتـوم در گـروه TA در زمـان‌هـای ۱۲ و ۱۸ ساعت پس از القاء فاز حاد به‌طور معنی‌داری بیشتر از گـروه PC بـود ($p<$ 0.01). در طی ۲۴ ساعت پس از القاء فاز حاد تفاوت معنـی‌داری در نرخ ضربان قلب بین گروه‌های FO و PC مشاهده نشد (شکل ۱- B). با این حال، در زمان‌های ۲، ۱۲ و ۱۸ ساعت پس از القاء فاز حاد، نرخ ضربان قلـب در گـروه TA بـه‌طـور معنـی‌داری بیشـتر از سـایر گـروه‌هـای تحـت چـالش لیپـوپلی‌سـاکارید بـود ($p<$ 0.01). تفـاوت معنی‌داری در نرخ تنفس بین گروه NC و سایر گروه‌های تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید در بازه زمانی ۳۰ دقیقه الی دو ساعت پس از القاء فـاز حاد مشاهده شد ($p<$ 0.01) (شکل ۱- C). با ایـن وجـود، هـیچ‌گونـه تفـاوت معنـی‌داری در نـرخ تـنفس بـین گـروه‌هـای تحـت چـالش لیپوپلی‌ساکارید مشاهده نشد و در همه آن‌ها نـرخ تـنفس بـا سـرعت زیادی پس از القاء فاز حاد افزایش یافت. حداکثر سطح نرخ تـنفس در یک ساعت پس از تزریق لیپـوپلی‌سـاکارید مشـاهده شـد (شـکل ۱). مطالعه حاضر، اولین گزارش از تأثیر مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی و چربی پیه بر علائم کلینیکی گوساله‌های تحت چالش لیپوپلی‌سـاکارید می‌باشد.

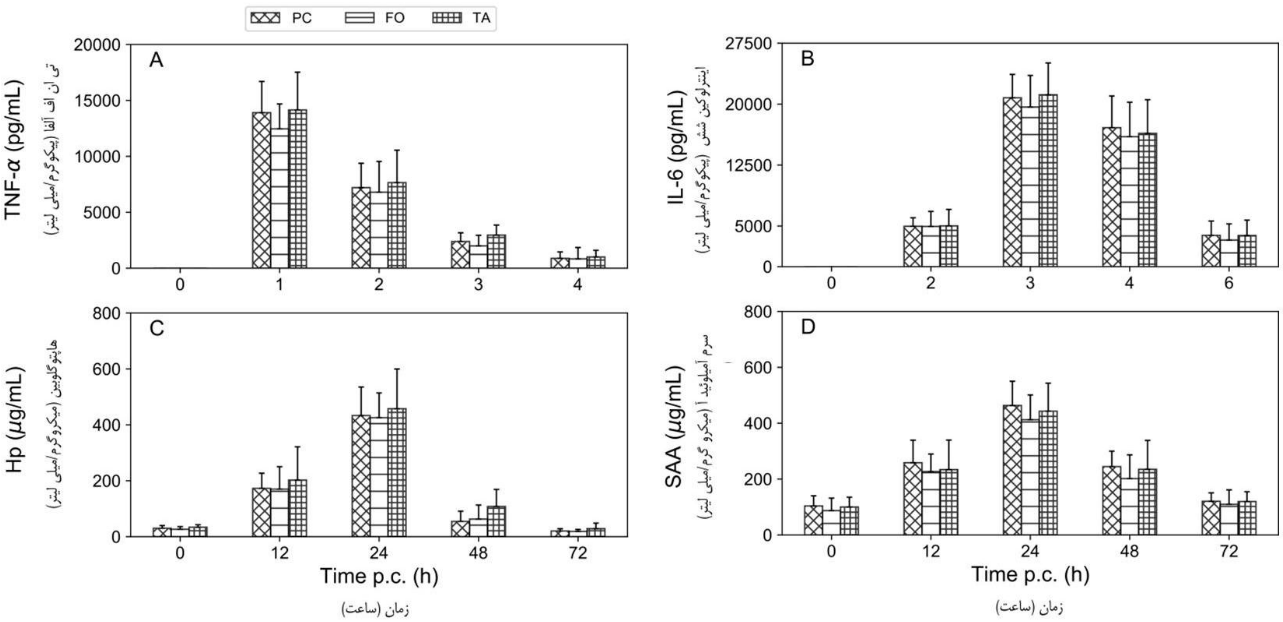


شکل ۲- اثر مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی و چربی پیه در پاسخ به چالش لیپوپلی‌ساکارید بر رفتار بیماری

Figure 2- Effect of short-term consumption of fish oil and tallow in response to the LPS challenge on the sickness behavior

مطالعات انجام شده بر انسان گزارش کرده‌اند، مصـرف اسـیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دوگانه (MUFA) نیز می‌تواند اثـر ضـد التهابی داشته و نسبتاً منجر به بهبود پاسخ پـیش التهـابی بـه‌ویـژه در مقایسه با اسیدهای چرب اشباع شود (۳۳). به‌دلیل آن که TA غنی از MUFA است، انتظار بر آن بود تا پاسخ فاز حاد در این گـروه بهتـر و یا هم سطح گـروه PC باشـد (جـدول ۲). بـرخلاف انتظـارات، نتـایج به‌دست‌آمده نشان داد، شدت بروز علائم کلینیکی در گروه TA بیشتر از گروه PC بود. در این آزمایش، نرخ ضربان قلب و طول مـدت تـب در طی ۱۸ ساعت اول تزریق لیپوپلی‌ساکارید در گـروه TA بـالاتر از گروه PC بود، به‌طوری‌که در زمان‌های ۱۲ و ۱۸ ساعت پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید دمای رکتوم و نرخ ضربان قلب در گروه TA بـه‌طـور معنی‌داری بیشـتر از گـروه PC بـود ($p < 0.01$) (شکل ۱- A و B). نتایج این آزمایش نشان داد، سطح زیر منحنی دمای رکتـوم در گـروه TA به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر گـروه‌هـای آزمایشـی بـود ($p<$ 0.01)، همچنین در گروه TA سطح زیر منحنی نـرخ ضـربان قلـب بیشتر از سایر گروه‌ها بـود و گـرایش بـه معنـی‌داری نشـان داد ($p=$ 0.06). در این مطالعه، هـیچ‌گونـه تفـاوت معنـی‌داری در سـطح زیـر منحنی نرخ تنفس بین گروه‌ها مشاهده نشـد (جـدول ۳). در آزمـایش پلیسر و همکاران (Plessers *et al.*, 2015) دو رونـد بـرای افـزایش دمـای رکتـوم و نـرخ ضـربان قلـب نشـان داده شـد، بـه‌طـوری‌کـه گوساله‌های تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید به دو گروه تقسیم شـده کـه در گروه اول توسعه التهاب با سرعت بیشتر و در گروه دوم بـا سـرعت

کمتری رخ داد. در این مطالعه، به‌دلیل آنکه تفاوت معنی‌داری در سطوح سایتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های فاز حاد بین گروه‌های TA و PC مشاهده نشد، به نظر می‌رسد تفاوت معنی‌دار در سطوح زیر منحنی دمای رکتوم و نرخ ضربان قلب به‌دلیل اثر بلندمدت لیپوپلی‌ساکارید بر گروه TA باشد.



شکل ۳– اثر مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی و چربی پیه در پاسخ به چالش لیپوپلی‌ساکارید بر سایتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های فاز حاد

Figure 3- Effect of short-term consumption of fish oil and tallow in response to the LPS challenge on the cytokines and acute phase proteins

در این آزمایش ،سطوح سایتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های فاز حاد در پاسخ به تزریق لیپوپلی‌ساکارید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که با نتایج مطالعات گذشته هم‌خوانی داشت (Roth and Blatteis, 2011; Plessers *et al*., 2015). حداکثر سطح TNF-α، IL-6، Hp و SAA به‌ترتیب در زمان‌های ۱، ۳، ۲۴ و ۲۴ ساعت پس از چالش لیپوپلی‌ساکارید مشاهده شد (شکل ۳). هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در غلظت‌های TNF-α، IL-6، Hp و SAA بین گروه‌ها پس از چالش لیپوپلی‌ساکارید مشاهده نشد. اگر چه سطوح سایتوکین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد بین گروه‌ها تفاوتی نداشتند ($p > 0.05$)، با این حال سطوح TNF-α، IL-6 و Hp در گروه TA بیشتر از سایر گروه‌ها بود. همچنین گروه FO کمترین سطح TNF-α، IL-6، Hp و SAA را در طی آزمایش نشان داد ($p > 0.05$) (شکل ۳). در این مطالعه، اثر معنی‌داری از گروه‌ها بر سطوح زیر منحنی سایتوکین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد مشاهده نشد (جدول ۳). در راستای مطالعات گذشته در این آزمایش نیز مطابق انتظار، ابتدا سطح TNF-α افزایش یافته و سپس با کاهش آن سطح IL-6 افزایش یافت (Roth and Blatteis, 2011; Plessers *et al*., 2015) (شکل ۳). TNF-α واسطه اصلی التهاب حاد در پاسخ به باکتری‌های گرم منفی می‌باشد و با تأثیر بر تولید سایر سایتوکین‌های التهابی به‌ویژه IL-6 منجر به افزایش سطح آن‌ها می‌شود (Conti *et al*., 2004). بالو و همکاران (Ballou *et al*., 2008) با استفاده از روغن ماهی نسبت اسیدهای چرب n-6/n-3 در جیره گوساله‌های شیرخوار را کاهش دادند و نشان دادند مکمل کردن روغن ماهی می‌تواند تحت شرایط التهاب حاد منجر به بهبود عملکرد سیستم ایمنی در گوساله‌ها شود. در این راستا، کارچر و همکاران (Karcher *et al*., 2014) نشان دادند، مکمل کردن روغن ماهی در جایگزین‌شونده‌های شیر می‌تواند تحت شرایط التهاب حاد منجر به کاهش بیان ژن TNF-α شود. همچنین موتوری و همکاران (Muturi *et al*., 2005) گزارش کردند، کاهش نسبت اسیدهای چرب n-6/n-3 در جیره گوساله‌های شیرخوار ممکن است پاسخ ایمنی به عفونت انگلی نماتدها را تقویت کند. نتایج این مطالعه برخلاف نتایج مطالعات گذشته (Muturi *et al*., 2005; Karcher *et al*., 2014) نشان داد، مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی منجر به بهبود سیستم ایمنی گوساله‌های شیرخوار تحت شرایط التهاب حاد نمی‌شود. این تفاوت در نتایج می‌تواند به‌دلیل تفاوت در طراحی آزمایش و به‌ویژه نحوه القاء فاز حاد در گوساله‌های شیرخوار باشد. با این حال، نتایج ما در راستای نتایج مک دونل و همکاران (McDonnell *et*

al., 2019) بود. آن‌ها نشان دادند مصرف روزانه ۴۰ گرم روغن ماهی اثری بر عملکرد سیستم ایمنی گوساله‌های شیرخوار نداشت.

از دیگر فاکتورهای حائز اهمیت در این آزمایش رفتار بیماری (sickness behavior) در گوساله‌ها پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید بود. در این مطالعه، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی در پیشرفت سه فاز رفتاری مشاهده نشد (شکل ۲). هیچ‌کدام از حیوانات تمایلی به مصرف خوراک و آب قبل از پایان فاز ریکاوری نشان ندادند. وقوع سرفه و تنفس دهان باز در طی فاز تنفسی بین گروه‌ها متفاوت نبود و تنفس قابل شنیدن در اغلب گوساله‌ها مشاهده شد. بر پایه مدل ارائه شده توسط پلیسر و همکاران (Plessers et al., 2015) به‌طور میانگین ریکاوری کامل گوساله‌ها در گروه‌های PC، FO و TA به‌ترتیب در ۷/۲، ۶/۶ و ۷/۶ ساعت پس از چالش لیپوپلی‌ساکارید رخ داد. ۱۲ ساعت پس از چالش لیپوپلی‌ساکارید همه گوساله‌ها وعده دوم نوبت شیردهی را مصرف کردند (Plessers et al., 2015). اگر چه تفاوت معنی‌داری در زمان ریکاوری گوساله‌ها مشاهده نشد، با این حال گوساله‌های تغذیه شده با روغن ماهی سریع‌تر از سایر گروه‌ها فازهای افسردگی و ریکاوری را به اتمام رساندند ($p > 0.05$) (شکل ۲). این نتیجه برخلاف نتایج آزمایش بالو و همکاران (۲) بود، به‌طوری‌که در آزمایش آن‌ها رفتاری بیماری در گوساله‌های تغذیه شده با روغن ماهی به‌طور معنی‌داری تعدیل یافته بود. با این حال، در آزمایش آن‌ها نیز همچون نتایج این آزمایش تغذیه روغن ماهی تأثیری بر اشتهای گوساله‌های تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید نداشت. تفاوت در القاء فاز حاد و مدت زمان مصرف روغن ماهی می‌تواند از عوامل تأثیرگذار بر عدم تطابق نتایج حاضر با نتایج بالو و همکاران (۲) باشد. برخی مطالعات سطوح پروستاگلاندین E2، TNF-α، IL-6 و IL-1β را به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های تب ناشی از تزریق لیپوپلی‌ساکارید معرفی کرده‌اند (Rocha et al., 2017 ; Brymer et al., 2019) (۷ و ۳۳). هاورن و همکاران (Howren et al., 2009) نشان داده‌اند افزایش سطح IL-6 مستقیماً با بروز و شدت افسردگی ارتباط دارد؛ بنابراین بروز فاز افسردگی پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید می‌تواند مرتبط با افزایش معنی‌دار سایتوکین‌های التهابی ناشی از لیپوپلی‌ساکارید باشد. همچنین با توجه به عدم تأثیر تیمارهای خوراکی بر سایتوکین‌های التهابی، عدم تفاوت بین گروه‌های آزمایشی در فازهای رفتاری می‌تواند قابل توجیه باشد. به‌علاوه بیان شده است، علاوه‌بر سایتوکین‌ها، عوامل دیگری مانند ایکوزانوئیدها، سیگنال‌های محیطی و انتقال‌دهنده‌های عصبی نیز می‌توانند بر بروز رفتار بیماری تأثیر بگذارند (Rocha et al., 2017). اطلاعات در رابطه با تأثیر روغن ماهی بر عواملی همچون ایکوزانوئیدها، سیگنال‌های محیطی و انتقال‌دهنده‌های عصبی تحت شرایط القاء فاز حاد در گوساله‌های شیرخوار در دسترس نیست و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

به نظر می‌رسد، علت اختلاف نتایج به‌دست آمده با نتایج سایر آزمایشات تفاوت در طراحی آزمایش و همچنین شیوه القاء فاز حاد در گوساله‌های شیرخوار باشد، به‌طوری‌که در مطالعه حاضر از مدل ارائه شده جهت القاء فاز حاد در گوساله‌های شیرخوار توسط پلیسر و همکاران (Plessers et al., 2015) استفاده شد، درحالی‌که در سایر مطالعات تفاوت چشمگیری در شیوه القاء فاز حاد وجود دارد، به‌طوری‌که برخی از آن‌ها از باکتری‌های گرم منفی کشته شده و برخی دیگر از واکسیناسیون استفاده کرده‌اند (Ballou et al., 2008 ; Karcher et al., 2014). همچنین برای اولین بار در این مطالعه به‌طور اختصاصی اثر روغن ماهی بر فازهای رفتاری و سطوح سایتوکین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد در طی بازه زمانی متوالی تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید بررسی شد. به‌علاوه به نظر می‌رسد در این آزمایش عدم تأثیر روغن ماهی بر سلامت گوساله‌های شیرخوار می‌تواند تحت تأثیر القاء فاز حاد، مدت زمان مصرف روغن ماهی، و یا تفاوت در سطوح مورد نیاز اسیدهای چرب غیر اشباع n-3 در گوساله‌های شیرخوار باشد. از جمله مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه اندازه نمونه می‌باشد، هر چند بر اساس آزمایشات پلیسر و همکاران (Plessers et al., 2015)، اوهتسوکا و همکاران (Ohtsuka et al., 1997) و چاران و کانتاریا (Charan and Kantharia, 2013) اندازه نمونه در نظر گرفته شده برای آزمایشات تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید قابل قبول می‌باشد. پیشنهاد می‌شود در آزمایشات بعدی سطوح اسیدهای چرب DHA و EPA و مجموع آن‌ها بر عملکرد سیستم ایمنی گوساله‌های شیرخوار در پاسخ به فاز حاد مورد ارزیابی قرار بگیرد. همچنین ترکیب روغن ماهی و داروهای ضد التهاب با هدف ارزیابی کاهش مصرف داروهای ضد التهابی بر عملکرد سیستم ایمنی گوساله‌های شیرخوار هلشتاین مورد مطالعه قرار بگیرد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد، مصرف کوتاه‌مدت روغن ماهی به‌منظور کاهش نسبت اسیدهای چرب n-6 به n-3 در جیره غذایی گوساله‌های شیرخوار نمی‌تواند تأثیری بر پاسخ فاز حاد در آن‌ها داشته باشد. به‌علاوه مصرف روغن ماهی نتوانست منجر به مهار تولید سایتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های فاز حاد در پاسخ به تزریق لیپوپلی‌ساکارید شود. همچنین مصرف روغن ماهی تأثیر معنی‌داری بر فازهای رفتاری در گوساله‌های تحت چالش لیپوپلی‌ساکارید نداشت، هرچند منجر به پایان سریع‌تر فاز افسردگی و ریکاوری در آن‌ها شد. در این مطالعه، افزایش مصرف اسیدهای چرب MUFA نیز تأثیری بر سطح سلامت گوساله‌های شیرخوار نداشت. به نظر می‌رسد، مطالعات بیشتری در زمینه میزان مصرف اسیدهای چرب DHA و

EPA و تأثیر آن بر عملکرد و سطح سلامت گوساله‌های شیرخوار مورد نیاز باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از زحمات آقایان دکتر قربانی، دکتر امینی، مهندس آتش افروز، مهندس شریعت رضوی و همچنین از مجموعه کشاورزی و دامپروری آستان قدس رضوی برای همکاری در انجام این طرح تشکر و قدردانی می‌کنند. این تحقیق با حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF, 97011137) و دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

References

1. Azizzadeh, M., Shooroki, H. F., Kamalabadi, A. S., & Stevenson, M. A. (2012). Factors affecting calf mortality in Iranian Holstein dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine, 104*(3-4), 335-340. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.12.007
2. Ballou, M. A., Cruz, G. D., Pittroff, W., Keisler, D. H., & DePeters, E. J. (2008). Modifying the acute phase response of Jersey calves by supplementing milk replacer with omega-3 fatty acids from fish oil. *Journal of Dairy Science*, *91*(9), 3478-3487. https://doi.org/10.1016/10.3168/jds.2008-1016
3. Baumann, H., & Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunology Today*, *15*(2), 74-80. https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90137-6
4. Billiar, T. R., Bankey, P. E., Svingen, B. A., Curran, R. D., West, M. A., Holman, R. T., Simmons, R. L., & Cerra, F. B. (1988). Fatty acid intake and Kupffer cell function: Fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery*, *104*(2), 343-349.
5. Bjørkkjær, T., Brunborg, L.A., Arslan, G., Lind, R.A., Brun, J.G., Valen, M., Klementsen, B., Berstad, A., & Frøyland, L. (2004). Reduced joint pain after short-term duodenal administration of seal oil in patients with inflammatory bowel disease: Comparison with soy oil. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *39*(11), 1088-1094. https://doi.org/10.1080/00365520410009429
6. Brunborg, L. A., Madland, T. M., Lind, R. A., Arslan, G., Berstad, A., & Froyland, L. (2008). Effects of short-term oral administration of dietary marine oils in patients with inflammatory bowel disease and joint pain: A pilot study comparing seal oil and cod liver oil. *Clinical Nutrition*, *27*(4), 614-622. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.01.017
7. Brymer, K. J., Romay-Tallon, R., Allen, J., Caruncho, H. J., & Kalynchuk, L. E. (2019). Exploring the potential antidepressant mechanisms of TNFα antagonists. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 98. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00098
8. Calder, P. C. (2012). Long-chain fatty acids and inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society*, *71*(2), 284-289. https://doi.org/10.1017/S0029665112000067
9. Calder, P. C. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? *British Journal of Clinical Pharmacology*, *75*(3), 645-662. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x
10. Charan, J. & Kantharia, N. (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, *4*(4), 303. https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726
11. Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C., & Bartfai, T. (2004). Cytokines and fever. *Frontiers in Bioscience*, *9*(12), 1433-1449. https://doi.org/10.2741/1341
12. Council, N. R. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. National Academy of Sciences, Washington, DC.
13. Cullor, J. S., (1992). Shock attributable to bacteremia and endotoxemia in cattle: Clinical and experimental findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *200*(12), 1894-1902.
14. Flaga, J., Korytkowski, L., Gorka, P., & Kowalski, Z. M. (2019). The effect of docosahexaenoic acid-rich algae supplementation in milk replacer on performance and selected immune system functions in calves. *Journal of Dairy Science*, *102*(10), 8862-8873. https://doi.org/10.3168/jds.2018-16189
15. Garcia, M., Shin, J. H., Schlaefli, A., Greco, L. F., Maunsell, F. P., Thatcher, W. W., Santos, J. E., & Staples, C. R. (2015). Increasing intake of essential fatty acids from milk replacer benefits performance, immune responses, and health of preweaned Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, *98*(1), 458-477. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8384
16. Gardner, I. A. & Greiner, M., (2006). Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: Improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Veterinary Clinical Pathology*, *35*(1), 8-17. https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2006.tb00082.x
17. Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T.A., & Koopmans, S.J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science, B*, *6*(11), 1045. https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1045
18. Hill, T. M., Vandehaar, M. J., Sordillo, L. M., Catherman, D. R., Bateman, H. G., & Schlotterbeck, R. L. (2011). Fatty acid intake alters growth and immunity in milk-fed calves. *Journal of Dairy Science*, *94*(8), 3936-3948. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3935

19. Howren, M. B., Lamkin, D. M., & Suls, J. (2009). Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: A meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*, *71*(2), 171-186. https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181907c1b
20. Kamel Oroumieh, S., Vanhaecke, L., Valizadeh, R., Van Meulebroek, L., & Naserian, A. A. (2020). Effect of nanocurcumin and fish oil as natural anti-inflammatory compounds vs. glucocorticoids in a lipopolysaccharide inflammation model on Holstein calves' health status. *Heliyon*. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05894
21. Karcher, E. L., Hill, T. M., Bateman, H. G., Schlotterbeck, R. L., Vito, N., M. Sordillo, L., & Vandehaar, M. J. (2014). Comparison of supplementation of n-3 fatty acids from fish and flax oil on cytokine gene expression and growth of milk-fed Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, *97*(4), 2329-2337. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7160
22. Lewis, M. D., & Bailes, J. (2011). Neuroprotection for the warrior: Dietary supplementation with omega-3 fatty acids. *Military medicine*, *176*(10), 1120-1127. https://doi.org/10.7205/milmed-d-10-00466
23. Liu, Y., Gong, L., Li, D., Feng, Z., Zhao, L., & Dong, T. (2003). Effects of fish oil on lymphocyte proliferation, cytokine production and intracellular signalling in weanling pigs. *Arch Tierernahr*, *57*(3), 151-165. https://doi.org/10.1080/0003942031000136594
24. Madland, T. M., Bjorkkjaer, T., Brunborg, L. A., Froyland, L., Berstad, A., & Brun, J. G. (2006). Subjective improvement in patients with psoriatic arthritis after short-term oral treatment with seal oil. A pilot study with double blind comparison to soy oil. *The Journal of Rheumatology*, *33*(2), 307-310.
25. McDonnell, R. P., O'Doherty, J. V., Earley, B., Clarke, A. M., & Kenny, D. A. (2019). Effect of supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and/or β-glucans on performance, feeding behaviour and immune status of Holstein Friesian bull calves during the pre-and post-weaning periods. *Journal of animal science and biotechnology*, *10*(1):1-17. https://doi.org/10.1186/s40104-019-0317-x
26. Muturi, K. N., Scaife, J. R., Lomax, M. A., Jackson, F., Huntley, J., & Coop, R. L. (2005). The effect of dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA) on infection with the nematodes *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Veterinary Parasitology*, *129*(3-4), 273-283. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.01.009
27. Ohtsuka, H., Higuchi, T., Matsuzawa, H., Sato, H., Takahashi, K., Takahashi, J., & Yoshino, T. O. (1997). Inhibitory effect on LPS-induced tumor necrosis factor in calves treated with chlorpromazine or pentoxifylline. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *59*(11), 1075-1077. https://doi.org/10.1292/jvms.59.1075
28. Olson, N. C., Hellyer, P. W., & Dodam, J. R. (1995). Mediators and vascular effects in response toendotoxin. *British Veterinary Journal*, *151*(5), 489-522.
29. Olsson, S. O., Viring, S., Emanuelsson, U., & Jacobsson, S. O. 1993. Calf diseases and mortality in Swedish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *34*(3), 263-269. https://doi.org/10.1186/BF03548190
30. Ortiz-Pelaez, A., Pritchard, D., Pfeiffer, D., Jones, E., Honeyman, P., & Mawdsley, J. (2008). Calf mortality as a welfare indicator on British cattle farms. *The Veterinary Journal*, *176*(2), 177-181. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.006
31. Plessers, E., Wyns, H., Watteyn, A., Pardon, B., De Backer, P., & Croubels, S. (2015). Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in calves with respect to the acute-phase response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *163*(1-2):46-56. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.005
32. Raboisson, D., Delor, F., Cahuzac, E., Gendre, C., Sans, P., & Allaire, G. (2013). Perinatal, neonatal, and rearing period mortality of dairy calves and replacement heifers in France. *Journal of Dairy Science*, *96*(5), 2913-2924. https://doi.org/10.3168/jds.2012-6010
33. Rocha, D. M., Bressan, J., & Hermsdorff, H. H. (2017). The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: A critical review. *Sao Paulo Medical Journal*, *135*(2), 157-168. https://doi.org/10.1590/1516-3180.2016.008607072016
34. Roth, J., & Blatteis, C. M. (2011). Mechanisms of fever production and lysis: Lessons from experimental LPS fever. *Comprehensive Physiology*, *4*(4), 1563-1604. https://doi.org/10.1002/cphy.c130033
35. Sadeghi, S., Wallace, F. A. & Calder, P. C. (1999). Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology*, *96*(3), 404-410. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00701.x
36. Seydel, U., Hawkins, L., Schromm, A.B., Heine, H., Scheel, O., Koch, M.H., & Brandenburg, K. (2003). The generalized endotoxic principle. *European Journal of Immunology*, *33*(6), 1586-1592. https://doi.org/10.1002/eji.200323649
37. Stanley, J. C., Elsom, R. L., Calder, P. C., Griffin, B. A., Harris, W. S., Jebb, S. A., Lovegrove, J. A., Moore, C. S., Riemersma, R. A., & Sanders. T. A. (2007). UK Food Standards Agency Workshop Report: The effects of the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. *The British journal of nutrition*, *98*(6), 1305-1310. https://doi.org/10.1017/S000711450784284X
38. Thies, F., Miles, E. A., Nebe-von-Caron, G., Powell, J. R., Hurst, T. L., Newsholme, E. A., & Calder, P. C. (2001). Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids*, *36*(11), 1183-1193. https://doi.org/10.1007/s11745-001-0831-4

39. Ulevitch, R.J., & Tobias, P.S. (1999). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Current Opinion in Immunology, 11*(1), 19-22. https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)80004-1
40. Van Amersfoort, E.S., Van Berkel, T.J., & Kuiper, J. (2003). Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology Reviews, 16*(3), 379-414. https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.379-414.2003
41. Wallace, F. A., Miles, E. A., & Calder, P. C. (2003). Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, *89*(5), 679-689. https://doi.org/10.1079/BJN1079/2002821
42. Wyns, H. (2014). Immunomodulation of veterinary drugs on lipopolysaccharide-induced inflammation in pigs: Influence of gamithromycin and ketoprofen on the acute phase response (Doctoral dissertation, Ghent University).
43. Zhang, H., Wang, Y., Chang, Y., Luo, H., Brito, L. F., Dong, Y., Shi, R., Wang, Y., Dong, G., & Liu, L. (2019). Mortality-culling rates of dairy calves and replacement heifers and its risk factors in Holstein cattle. *Animals (Basel)*, *9*(10), 730. https://doi.org/10.3390/ani9100730